

COMMENTARY

生体試料を対象にした質量顕微鏡

Mass Microprobe Aimed at Biological Samples

内藤 康秀*
Yasuhide NAITO

(Received December 9, 2004; Accepted February 26, 2005)

Mass microprobe acquires mass-to-charge ratios of ions which are generated at an extremely small area on the sample surface. A raster achieved by moving the area of ionization over the sample surface allows to map a wide variety of compounds existing on the surface with a lateral resolution of 1–100 μm . The technology to visualize a local distribution of compounds in the sample is called imaging mass spectrometry and is recognized as an emerging field of mass spectrometry in recent years. Mass microprobe can now be applied to biological samples, such as thin tissue sections, after significant progress of sample preparation techniques. SIMS, LDI, and MALDI are ionization methods utilized in mass microprobe. Molecular images of light compounds, such as lipids or metabolites, are suited to be recorded by SIMS or LDI, whereas peptides and proteins are targeted by MALDI. Although the sensitivity is the most important issue still to be overcome, mass microprobe is superior to optical observations for providing chemical information on biological samples, and is highly promising as a practical tool of biological researches in very near future.

1. はじめに

質量顕微鏡 (mass microprobe) とは、イオン生成が行われる試料表面上の部位を極小化し、かつ、その部位を任意に制御することで、試料表面上における物質の局在状態を観察できるようにした質量分析計である。質量顕微鏡を用いて物質分布を可視化する質量分析の技法は、イメージング質量分析 (imaging mass spectrometry) または分子イメージング (molecular imaging) と呼ばれ、生体試料にも応用されるようになり、ここ数年連続してアメリカ質量分析学会 (ASMS) での口頭発表セッションが企画されるなど注目を集めている^{1)~7)}。実際には生体試料測定用として開発されて実績のある質量顕微鏡の市販機はまだ存在しないので、装置の改造または測定の工夫などの技術的困難を伴う。しかし、分子の質量は特異性 (specificity) の高い化学情報であり、質量に基づいて物質分布を観察する質量顕微鏡は、染色やタグを併用した光学顕微鏡による観察を補完する手段として、生物学・医学分野への応用が極めて有望である。

なお、「質量顕微鏡」の英訳として「mass microscope」という呼称もありうる。本稿の後半で述べるように、mass microscope と mass microprobe は異なる方式 (概念) である。現在までに報告されているイメージング質量分析のほとんどは mass microprobe によるものであり、本稿の内容もこれを中心に論じているため、また両者の混同を避けるため、本稿ではあえて「mass microprobe」を「質量顕微鏡」の英訳として採用したが、これらを網羅できる統一された用語 (英語にはまだ存在しない) の意味を「質量顕微鏡」に込めている。

2. 原理と装置

2.1 イメージング質量分析の概要

物質分布像は試料表面上にわたってイオン生成部位を移動させて獲得する。移動の方式はテレビの走査線と同じで、一定の移動量で横方向の一定区間を走査した後、縦方向に移動して再び横方向の一定区間の走査を繰り返すことで、方形のイメージング領域を得る。イメージング領域を分割した極小の単位をピクセル (pixel) と呼ぶ。ピクセルの一辺の長さはイオン生成部位を走査する際の移動量に相当する。ピクセルの総数はイメージング領域とピクセルのサイズに依存し、例えば 50 μm \times 50 μm のピクセルサイズで観察する場合、1 cm \times 1 cm のイメージング領域は 200 \times 200 = 40,000 ピクセルを含んでいる。一つのピクセルが1件の質量スペクトルに対応するので、この場合は40,000件の質量スペクトルを測定する。

物質分布像の出力は、標的となる m/z ごとにイメージング領域をグレイスケール画像で表示するのが一般的であり、イオン信号の強度 (イオン電流値またはイオンカウン

* 大阪大学大学院工学研究科自由電子レーザー研究施設
(☎573-0128 枚方市津田山手 2-9-5)

Institute of Free Electron Laser, Graduate School of Engineering, Osaka University (2-9-5 Tsuda-Yamate, Hirakata 573-0128, Japan)

E-mail: naito@fel.eng.osaka-u.ac.jp

現連絡先: 光産業創成大学院大学 (☎431-1202 浜松市呉松町 1955-1)

The Graduate School for the Creation of New Photonics Industries (1955-1 Kurematsu-cho, Hamamatsu 431-1202, Japan)

E-mail: naito@gpi.ac.jp

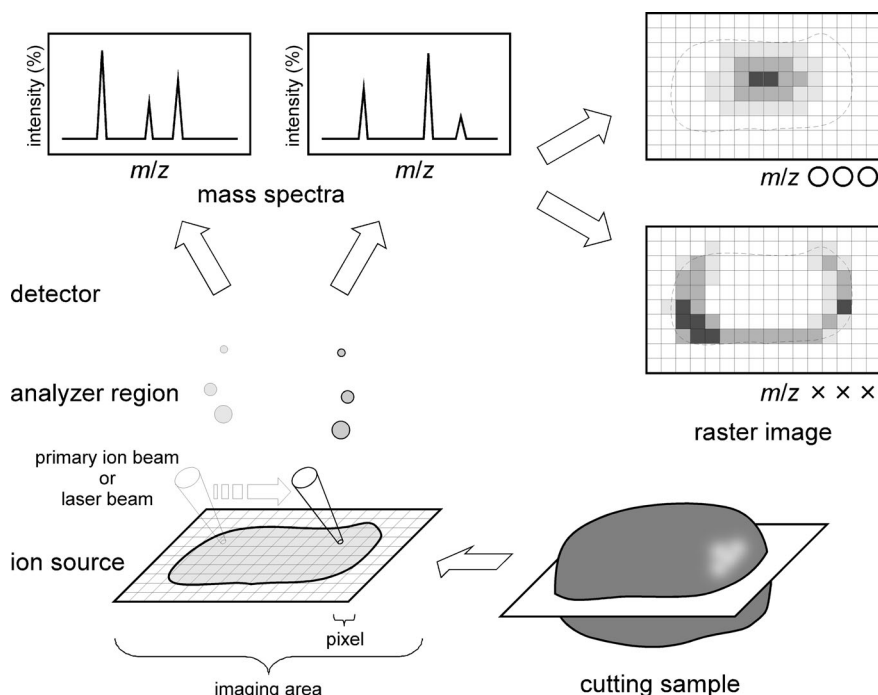


Fig. 1. Principle of imaging mass spectrometry with mass microprobe. A thin flat sample, such as a tissue section, is subjected to SIMS, LDI, or MALDI source. The area of ionization on the sample surface is clearly identified by the small exposure spot of primary ion beam (SIMS) or pulsed laser beam (LDI or MALDI). Thus a mass spectrum corresponding to a particular location (pixel) on the sample surface is recorded. Imaging is achieved by scanning pixels over the sample surface. After the whole mass spectra being recorded, peak intensities at each m/z are converted to gray scale tones of image pixels, i.e., a darker represents a higher intensity, to create raster images. Each m/z gives a raster image, which is the molecular image of that m/z over the sample surface.

ト数) をピクセルの灰色の濃淡で表現する。ほかに、垂直軸をイオン信号強度にした3次元図形や、カラー画像での表示も行われる。カラー画像は視覚的効果を改善するだけでなく、一つの画像の中に複数の物質の分布を表示できる利点がある。面分解能 (lateral resolution) は、試料表面上の識別可能な2点間の最小距離として定義される。面分解能に関係する因子として、イオン生成部位の移動量 (ピクセルの一辺の長さ) がある。原理的には、試料表面でのイオン生成部位の広がり が面分解能の限界を与える。イオン生成部位の広がり に比べて移動量を小さく設定した場合がオーバーサンプリング、大きく設定した場合がアンダーサンプリングである。予備的に物質分布を粗くサーベイする場合はアンダーサンプリングするが、通常はオーバーサンプリング条件下で測定する。

2.2 イオン源

イオン源は質量顕微鏡を特徴づける最も重要な構成要素である。質量顕微鏡の扱う試料は広い意味での固体 (凝縮相) なので、気体状のイオンを固相から直接生成できる脱離イオン化法が必須であり、イオン生成部位を制御する要請から利用可能なイオン化法はさらに限定される。これまでに、イオンビームを試料に照射する2次イオン質量分析 (secondary ion mass spectrometry; SIMS)、レーザービームを照射するレーザー脱離イオン化 (laser desorption/ionization; LDI)、および、高分子化合物のイオン化を補助するマトリックス (matrix) を試料表面に添加してレーザービームを照射するマトリックス支援レーザー脱離

イオン化 (matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI) が用いられている。

2.2.1 2次イオン質量分析 (SIMS) SIMSでは3~25 keVに加速し収束させた1次イオンビームを高真空中で試料に照射し、試料表面から物質が放出 (スパッタ) される際に生成する2次イオンを利用する。試料表面深さ方向の高感度な元素組成分析が行えるので、半導体分野における重要な分析手段として発達した。Ga⁺ や In⁺ のイオンビームを発生する液体金属イオン源 (liquid metal ion source; LMI) は代表的な1次イオン源であり、イオンビームのスポット径は通常1 μm (最高で100 nm) まで収束できるが、操作が複雑かつ高価である。より安価で簡易的な1次イオン源としてCs⁺ イオン銃などがあり、2~3 μmのスポット径を得ている。

かつては試料分子を破壊するので有機化合物の測定には適さないと考えられていたが、1次イオン照射量の制限による有機分子イオン化の成功がBenninghovenによって報告されて以来⁸⁾、生体試料を含めた有機化合物のSIMS測定 (organic SIMS) が本格的に行われるようになった。有機分子由来の2次イオン生成は、1次イオンの積算照射量が一定の値 (static SIMS limit) を超えるとしだいに減少し消滅する。試料や1次イオン種によってstatic SIMS limitは異なるが、およそ10¹³~10¹⁴個/cm²であり、1次イオン電流密度1 nA/μm²の場合では照射時間約15~150 μsに相当する。これはSIMSによるイメージング質量分析の大きな障害になっている。2次イオン生成量の減

少は、スパッタされずに試料表面にとどまる物質が蓄積し、化学的損壊を受けた分子によって表面がコーティングされた状態になるためと考えられている。グリセロールの高質量多量体で試料表面を衝撃 (massive cluster bombardment) し、表面内部物質に損壊を与えずに最表面層を除去して2次イオン生成量を復活させる技法が提案されている⁹⁾。

またSIMSには、1次イオンの電荷による試料のチャージアップの問題があり、試料にたまる電荷を中和する機構 (charge compensation) をイオン源に備える必要がある。質量顕微鏡では、試料表面上を横切るように5~10 eVに加速した帯状の電子線を連続照射し、1次イオンビームと2次イオン抽出を遮断する期間 (走査線を縦方向に移動させる期間) に、電子をチャージアップした試料表面に付着させて中和している。

2.2.2 レーザー脱離イオン化 (LDI) LDIは試料に対して局所的に作用するエネルギー源を、SIMSにおける1次イオンビームからレーザービームに置き換えたものと理解できる。しかし、光照射に固有の問題がある。(1) 光子吸収によってのみ光エネルギーは熱エネルギーに変換できるので、試料または媒質によって吸収される波長のレーザーが必要である。(2) 臨界温度を超える高温下では分子の熱分解と気化の速度を逆転できるので、試料分子の気化に十分な照射パワー密度が必要である。(3) 時間発展的な過程なので、適切なパルス幅のレーザーが必要である。また、レーザービームを収束させる目的から、集光位置におけるスポット径の理論上の最小値 (回折限界) はレーザー波長に依存するので、紫外 (UV) レーザーが好ましい。4倍波のNd:YAGレーザー (波長266 nm, パルス幅10 ns, パルスエネルギー10 mJ) は代表的なレーザー光源であり、スポット径は0.5 μmまで収束できるが、通常は1~5 μm程度のスポット径で使用する。最適な照射強度は試料によって異なり、調光器 (NDフィルタなど) を通したレーザービームを照射するが、有機化合物由来のイオンは照射パワー密度 $10^6 \sim 10^{10}$ W/cm²で得られている。照射方向は試料の表側 (反射型, reflection type), すなわち脱離イオンを引き出す方向だけでなく、透明なサンプルステージを通して試料裏側 (透過型, transmission type) から可能であり、電極や光学部品などを配置するイオン源設計の自由度を高めるが、透過型ではサンプルの厚さは1 μm以下に制限される。LDIは試料表面がチャージアップする心配がなく、パルス照射なのでstatic SIMS limitに相当するイオン生成量の減少もSIMSほど顕著ではない。しかし1パルス照射ごとのイオン生成量はわずかであり、通常は複数回のパルス照射で測定と信号積算を繰り返さなければならない。

2.2.3 マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) Organic SIMSやLDIの実用的な質量範囲は500程度までであり、これを超える質量域、特にタンパク質を標的とした測定ではマトリックスの利用が必須となる。マトリックスには高分子の分解を抑え脱離やイオン化

(プロトン移動) を促進する作用がある。MALDIによるイメージング質量分析ではシナピン酸 (sinapinic acid; SA) が最も用いられ、微結晶の薄層で試料表面をコーティングする。MALDIは分子量10万を超えるタンパク質のイオンを生成し、LDIに比べて感度を格段に向上できる。また、マトリックスの種類によるイオン化標的分子の選択も可能である。しかし、マトリックス溶液の溶媒組成や添加法によっては、試料表面からの物質の溶出・再付着のおそれがあり、物質分布が置き換わる可能性に留意する必要がある。また、マトリックス内部でのエネルギー伝播により、実際のイオン生成部位は照射スポット径よりもかなり拡がるため、レーザービームを極限に収束しても高い面分解能の達成は困難である。代表的なレーザー光源として、N₂レーザー (波長337 nm, パルス幅4 ns) や3倍波Nd:YAGレーザー (波長355 nm, パルス幅10 ns) がある。照射パワー密度はLDIに比べてかなり小さく、 $10^5 \sim 10^8$ W/cm²程度である。LDIと同じく、10~100回程度のパルス照射で測定と信号積算を繰り返す。

2.2.4 SIMSにおけるマトリックスの添加 グリセロールなどの揮発性液状化合物の添加は、SIMSの1次イオンの衝撃を緩和する。添加物が液体マトリックスとして作用することから、液体2次イオン質量分析 (liquid-SIMS, LSIMS) と呼ばれ、実用的な質量範囲は3,000程度まで拡大する。有機化合物のSIMS測定ではごく一般的な方法であるが、質量顕微鏡には推奨できない。LSIMSには試料最表面層の損壊物質を除去する自己洗浄効果があり、static SIMS limitを克服して感度は向上するが、物質分布は乱される。MALDIのように固体マトリックスを用いれば物質分布を保持できる。その例として、金蒸着した試料からSIMSによって高分子が測定されている¹⁰⁾。

2.2.5 イオン生成部位の走査 LDIやMALDIでは通常、レーザービームの光軸を固定して自動サンプルステージにより試料表面上のレーザー照射部位を移動する。ステッピングモーターを用いた自動ステージで位置精度±5 μmを得ている。さらに高精度に位置決めする場合は、ピエゾ素子を用いたステージ移動機構で20 nmの精度を得る。

SIMSではサンプルステージの位置を固定し、1次イオンビームを静電場または磁場により偏向させて照射部位を移動する。この方式はメカニカルな機構をもたないため、高速の移動が可能であり高精度で信頼性も高い。しかし、2次イオン光学系の中心軸に対して1次イオン照射部位が変位するため、SIMSでは試料表面上の照射可能な範囲 (視野) に制限が生じる。この変位の影響を補正して視野を広める技法 (dynamic emittance matching; DEM) も考案されている¹¹⁾。

2.2.6 モニタリング光学系 試料表面の実際の拡大画像 (形態) は、試料の状態や照射位置の確認だけでなく、物質分布像の対象データとしても研究上極めて重要である。ビデオモニタによる実画像のリアルタイム表示・記録が望ましい。1次イオンまたはレーザーのビームパス、お

よび分析部イオン光学系と干渉しないモニタリング光学系の配置は、イオン源に関する設計工学的な課題の一つである。またLDI質量顕微鏡のイオン化用レーザーを活用した、共焦点レーザー顕微鏡によるモニタリング光学系開発の試みもある¹²⁾。

2.3 分析部

質量顕微鏡の分析部は、原理的にすべての質量分離方式(四重極(quadrupole)、扇形磁場(magnetic sector)、飛行時間(time-of-flight; TOF)、イオントラップ(ion trap; IT)、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴(Fourier transform ion cyclotron resonance; FT-ICR)、およびこれらのタンデム型、ハイブリッド型など)が可能であり、実際にさまざまな組合せの装置が開発されている。分析部の条件として(1)短い分析サイクル(2)高いイオン透過率(transmittance)、が挙げられる。膨大な数の質量スペクトルを取得するイメージング質量分析では、分析サイクルの長いトラップ方式(IT, FT-ICR)は本質的に不利である。

TOFは分析サイクルが最短であり、イオン透過率も100%に達するので、質量顕微鏡の分析部として最適である。SIMSを接続する場合は、1次イオンビームをパルス化して2次イオンをパルス状に生成するか、または直交加速法(orthogonal acceleration)によって2次イオンをパルス状に加速する必要がある。

四重極は m/z の透過帯を固定すると高感度のマスフィルタとして動作するので、1種類のみを分子を標的としたイメージング質量分析には適している。連続的にイオンを生成するSIMSとの接続に最適であるが、LDIやMALDIとの接続も可能である。

質量顕微鏡の分析部のタンデム化(MS/MS)は、イオン透過率の低下、分析サイクルやデータ処理量の増大といった困難な課題を抱えるが、未知物質を対象にした分子イメージングでは有望である。

2.4 検出器とデータシステム

質量顕微鏡は一般の質量分析計と同じ検出器(電子増倍管やマルチチャンネルプレートなど)を用いているが、低いイオン生成量での測定となるため、検出限界や感度の要求仕様は一般の質量分析計よりも高い。超伝導トンネル接合型(superconducting tunnel junction)検出器による高感度化の試みがあり¹³⁾、さらなる開発が期待される。

質量顕微鏡のデータシステムは、一般の質量分析計でのその役割に加えて、(1)質量スペクトルからのイメージング用データの抽出、(2)物質分布像の各ピクセル表示内容の更新、(3)物質分布像データの圧縮・保存、(4)イメージングに付随するハードウェア(サンプルステージ移動機構など)の自動制御、のすべてをリアルタイムで遂行する。既存の質量分析計を改造した質量顕微鏡では、このような機能をもつデータシステムを自作している(例:ヴァンダービルト大学のMS Image Tool¹⁴⁾)。市販の質量顕微鏡は物質分布像を特殊なファイル形式のデジタルイメージとして保存するが、TIF形式(tagged image file format)など一般的なイメージファイル形式にエクスポートし、市

販またはパブリックドメインの画像処理ソフトウェア(NIH Image¹⁵⁾など)を用いた物質分布像解析もよく行われる。

3. 測定の実際

3.1 試料調製法

質量顕微鏡の試料調製にはSEMと共通する側面があるが、SEMでは試料形態の保持だけが問題になるのに対し、質量顕微鏡では物質分布を保持する必要があるため、条件はさらに厳しくなる。SEMの試料調製でよく用いられる固定剤は、ケミカルバックグラウンドになるうへ架橋反応などを引き起こして測定を妨害するので使用できない。軟組織試料には、(1)瞬間冷凍して薄くスライスし、真空乾燥後に常温下でイオン源に導入する(freeze-dry)、(2)瞬間冷凍して薄くスライスし、含水状態のまま低温下でイオン源に導入する(hydrated-cryogenic)、(3)常温で切断し、断面にポリエチレン膜などをあてて表面物質を移し取りイオン源に導入する(membrane-blotting)、などの調製法があり、それぞれに長短がある。(1)の方法では、乾燥時に組織切片が収縮・変形(イメージングでは試料は平面状でなければならない)、基材に貼り付くなど扱いが困難である。揮発性成分も失われる。(2)の方法は複雑で高価な装置を必要とし、水分(氷や霜)で覆われた試料の効率的なイオン化が問題になる。(3)は明らかに簡易的な方法であり、ある程度の物質分布の乱れは避けられず、標的分子の種類や存在量によって対象は限られる。しかし膜素材やプロット法によって移し取りに選択性を与えることはできる。より簡便な方法として、リン脂質などの組織中に大量に存在する物質については、組織の切断面を直接サンプルプレートに付けて移し取ることもできる。細胞試料についてはレーザーマイクロダイセクション(laser capture microdissection, LCM)を用いた調製法がある¹⁶⁾。また単細胞生物を瞬間冷凍し、イオン源に結合した真空容器内で切断または切開する技法も考案されている¹⁷⁾。MALDIの試料調製ではさらにマトリックス添加を行う。それには(1)マイクロピペットを用いてマトリックス溶液を試料に滴下し、常温下で自然乾燥させる、(2)エアスプレーを用いてマトリックス溶液を試料に向けて噴霧し、常温下で自然乾燥させる、(3)あらかじめマトリックスでコーティングしたプレートに試料を載せる、などの方法がある。(1)や(2)のマトリックス添加法では、試料表面から物質が溶出しないうような注意が必要であり、マトリックス溶液の滴下量は一般的なMALDI測定に比べてかなり小さい(~200 nL)。試料切片の標準的な厚さはSIMS, MALDIともに10~20 μm である。

3.2 SIMSによる測定例

SIMSを用いた質量顕微鏡は高い面分解能と高速イメージングを特長とし、一例として40,000ピクセルのイメージング領域を約3分間で取得する。市販装置にはIMS(CAMECA社)やTOF-SIMS(Ion-Tof社)、TRIFT(Physical Electronics社)があり、いずれもかなり普及している

Table 1. Current Researches for MALDI Mass Microprobe

Institute	Leader	Main research activities
Vanderbilt Univ., U.S.A.	R. M. Caprioli	Instrumentation, Method development, Molecular imaging of proteins in tissue and cell
Univ. Illinois, U.S.A.	J. V. Sweedler	Method development, Molecular imaging of peptides in cell
Novartis Pharma AG, Switzerland	M. Stoeckli	Instrumentation, Method development, Molecular imaging of peptides in tissue
Univ. Giessen, Germany	B. Spengler	Instrumentation (built in-house), Method development
FOM-AMOLF, The Netherlands	R. M. A. Heeren	Instrumentation (stigmatic mode), Method development
Sheffield Hallam Univ., U.K.	M. Clench	Method development
Penn. State Univ., U.S.A.	N. Winograd	Molecular imaging of light compounds in epidermis
ICSN-CNRS, France	O. Laprevote	Instrumentation, Method development (LDI from frozen aqueous matrix)
Iowa State Univ., U.S.A.	E. S. Yeung	Instrumentation (MALDI and Cluster-SIMS), Method development ^{a)}
Univ. Metz, France	J.-F. Muller	Method development (colloidal metal additive LDI), Molecular imaging of light compounds ^{b)}
EMSL-PNNL, U.S.A.	K. M. Beck	Instrumentation
Univ. Manitoba, Canada	W. Ens	Method development ^{c)}
Texas A&M Univ., U.S.A.	D. H. Russell	Instrumentation (orthogonal-configuration) ^{d)}
Applied Biosystems/MDS Sciex, Canada	J. Y. Zhao	Instrumentation (DMA ^{f)} optics, ion-mobility device ^{g)}
		Instrumentation, Method development, Molecular imaging of light compounds in tissue

^{a)} A. Brunelle, *et al.*, Proceedings of the 52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville, TN, May 23-27, 2004, WOBpm04 : 00

^{b)} C. Slusznay and E. S. Yeung, Proceedings of the 52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville, TN, May 23-27, 2004, TPL208

^{c)} J.-F. Muller, *et al.*, Proceedings of the 51st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Montreal, Canada, June 8-12, 2003, MPY497

^{d)} D. S. Wunschel and K. M. Beck, Proceedings of the 51st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Montréal, Canada, June 8-12, 2003, MPY499

^{e)} G. Piyadasa, *et al.*, Proceedings of the 52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville, TN, May 23-27, 2004, TPL207

^{f)} Digital mirror array

^{g)} S. D. Sherrod, *et al.*, Proceedings of the 52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville, TN, May 23-27, 2004, TPL209

が、おもに元素分析に利用されている。オークリッジ国立研究所のグループは、自作の質量顕微鏡（タンデム四重極型）を軟組織試料（マウス脳切片）に適用し、リン脂質 (phosphatidylcholine) 分布を測定している¹⁸⁾。フラグメントイオンのみが検出されるため、リン脂質の親水性頭部に由来する特徴的なフラグメントイオン (m/z 184) についてイメージングを行っている。ペンシルバニア州立大学のグループは、市販の TOF 質量分析計 (Kratos 社) を改造した質量顕微鏡を用いて、コカインやジメチルスルホキシドを投与したゾウリムシ 1 細胞スケールのイメージング質量分析を行っている¹⁷⁾。

3.3 LDI による測定例

LDI を用いた質量顕微鏡は、レーザー顕微質量分析 (laser microprobe mass spectrometry; LMMS) として 1980 年代から研究されており^{19), 20)}、市販装置には LAMMA (Leybold-Heraeus 社、のちに SPECS 社) や LIMA (Cambridge Mass Spectrometry 社、のちに Kratos 社) がある。これらはサンプルステージ移動機構を備えるが、イメージングの機能がないため、スポット分析 (mass microprobe profiling) に用いられる。金属元素の検出感度が高いので、生体試料については無機化合物の測定

例が多い。毒性ニッケル化合物 ($\alpha\text{Ni}_3\text{S}_2$) 投与後の、マクロファージ (guinea pig alveolar) 中の含ニッケル代謝物の測定例などがある。有機化合物の測定例では、抗ハンセン病薬 Clofazimine を投与したマウスの脾臓堆積物や、植物の抗菌活性物質 (phytoalexin) などがある。またアントワープ大学のグループは、市販の FT-ICR 質量分析計 (Bruker Daltonics 社) を質量顕微鏡に改造し、地衣類に含まれる色素から新規性のあるキノン類を同定している。これらの応用例は、物質の局在化情報の取得よりも、前処理工程で失われやすく採集の困難な微量含有成分を最小限の試料調製によって分析したことに特徴がある。

3.4 MALDI による測定例

MALDI を用いた質量顕微鏡は、イメージング質量分析の手段として現在最も活発に研究されている (Table 1)。ヴァンダービルト大学のグループは、市販の MALDI-TOF 質量分析計 (Applied Biosystems 社) を改造し、さまざまな軟組織についてタンパク質を標的にしたイメージング質量分析を行っている。膠芽腫細胞 (D54) の異種移植片 (マウス後肢) における免疫調節分子 (thymosin β .4) の分布測定例などがある。ノバルティスファーマ社のグループは、同様に市販の MALDI-TOF 質量分析計を改造した

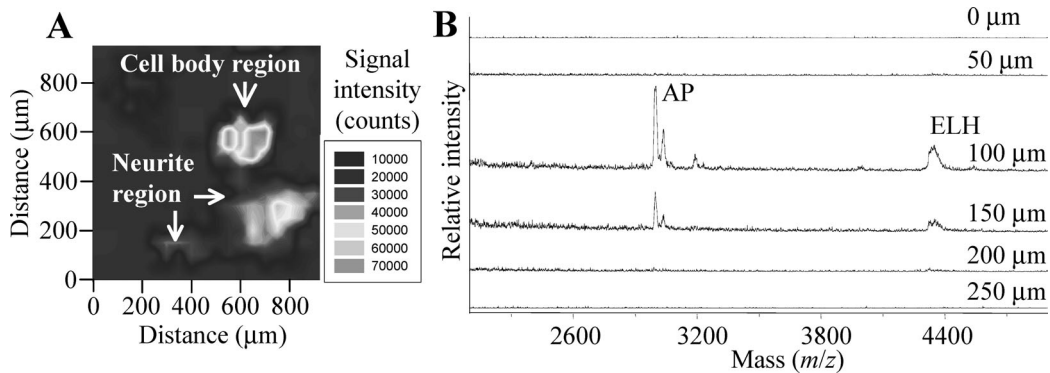


Fig. 2. An example of MALDI mass microprobe data obtained from single cultured cerebral ganglion neuron of *Aplysia californica*. (A) Raster image showing the spatial distribution of peptide with m/z 4617. (B) Mass spectra which were taken from spots located on a line with their centers separated by $50\ \mu\text{m}$. Peaks are detected that correspond to physiological active neuropeptides: AP, acidic peptide; ELH, egg laying hormone. MALDI matrix: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (A) or sinapinic acid (B); 50 mg of each matrix was dissolved in 1 mL of acetone. (Figure supplied courtesy of J. V. Sweedler and reprinted with permission from ref. 22. Copyright 2003 American Chemical Society.)

質量顕微鏡を用いて、アルツハイマー症モデル動物 (APP 23 トランスジェニックマウス) の脳切片における amyloid β ペプチド分布を半定量的に評価している²¹⁾。またイリノイ大学のグループは、アメフラシ (*Aplysia californica*) の神経節から抽出し培養した神経細胞を対象にして、1細胞スケールで神経ペプチドについてのイメージング質量分析を行っている (Fig. 2)²²⁾。低分子を標的としたイメージング質量分析は、(1) マトリックス添加時に標的分子が試料表面から溶出しやすく、(2) 質量スペクトル上でマトリックスのピークに妨害されやすいため、MALDIでは一般に困難であるが、臓器に蓄積または表皮に浸潤させた薬剤分布なども測定され始めている^{23), 24)}。

4. 開発課題

4.1 感度の課題

質量顕微鏡の基本性能の指標は、質量分解能、質量真度、質量範囲、検出限界、感度、定量性、測定時間、面分解能などがあり、すべて重要であるが、現状で最も優先すべきは感度の向上である。イメージング質量分析の興味の対象はヘテロな物質分布でありながら、微量成分のイメージングには感度が不十分のため、測定例はリン脂質などのユビキタな対象に集中している。開発課題はイオン化法と検出器に集約される。例えば SIMS の場合、2次イオン生成率はスパッタされる総物質量の 0.1~1% である。1 μm^2 の照射領域の表面に 4×10^6 個の分子が存在し、その中で標的分子のモル比を 1% とした場合、照射領域の全表面分子がスパッタされたとしても標的分子のイオンは最高で 400 個しか生成しない。イオン透過率 100% の分析部 (TOF) であれば 400 個のイオンが検出器に飛来するが、現在の検出器技術ではイオン量の多寡 (定量性) の評価に十分な数ではない。すなわち、面分解能と定量性も感度の課題に帰結する。LDI のイオン生成も最表面層に限定され、照射領域の深さ 50 nm までの体積内に 10^8 個以上の分子が必要と見積もられている²⁵⁾。MALDI はイオン化効率の向上に

よる感度改善の余地を多く残しているが、そのためにはイオン化機構のより深い解明が必要である。MALDI におけるイオン生成量増大の背景には、マトリックスの溶媒作用 (凝集力の緩和) があり、厳密な物質位置情報の取得には疑念を与える。マトリックス添加を用いない "MALDI" (LDI と区別するためあえてこのように表記する)、例えばシリコン表面上脱離イオン化 (desorption/ionization on silicon; DIOS)²⁶⁾ や、生体試料中に元々存在する大量の媒質分子をマトリックスに用いる MALDI^{27), 28)} は、質量顕微鏡のイオン化法として検討に値する。

4.2 面分解能の課題

SEM における 2次電子放出と脱離イオン化では現象のスケールは異なるが、質量顕微鏡でもサブミクロンの面分解能は原理的に可能である。しかし、イメージング領域の実用的サイズと高い面分解能の両立を目指せばピクセルは莫大な数になり、現実的な時間内に測定することが問題になる。MALDI を用いた質量顕微鏡で、高繰返し周波数の固体レーザーを用いた高速化の試みがあるが^{12), 21), 29)}、このアプローチにも限界がある。そこでピクセルを走査する方式 (scanning mode) とは別に、試料表面上における物質の 2次元分布を反映するようにイオンを面状に生成し、イオンの相対的な位置関係を保持したまま m/z に基づいて分離した後、位置検出可能な検出器にイオン像を投影する方式 (stigmatic mode) が考案されている。光学的な像と同様に、イオン像は相似な図形に縮小・拡大することが可能である。拡大イオン光学系 (静電レンズ) を分析部の前段または後段に配置すれば、拡大したイオン像を検出器に投影できる。これは質量マイクロスコプ (mass microscope) と呼ばれる (Fig. 3)。面分解能は静電レンズの像倍率と検出器の面分解能に依存するが、原理的にピクセル走査方式より高くできる。検出器の独立したチャンネル数 (CCD 素子の画素数に相当する) が多ければ、多数のピクセルを一度に測定して高速化できる。イオン像投影方式の分析部は TOF であり、市販の質量顕微鏡にはこの方式を

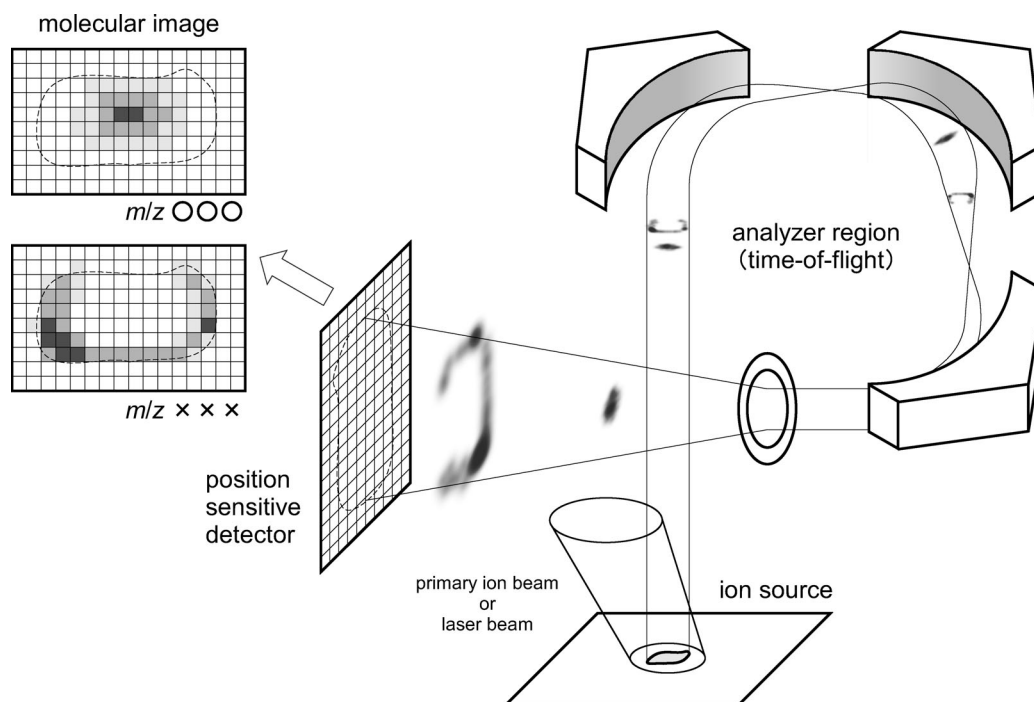


Fig. 3. Schematic diagram of a stigmatic mode (mass microscope). Relative positions of analytes within the exposure spot of pulsed primary ion beam (SIMS) or pulsed laser beam (LDI or MALDI) are conserved through flying in the mass analyzer region, which consists of stigmatic achromatic ion transfer optics. Each bunch of ions separated according to the flight time (m/z) is subjected to magnification with electrostatic lenses followed by a position sensitive detector to create the enlarged molecular image directly.

採用したものがあ (TRIFT)^{30, 31}. FOM 研究所 (オランダ) のグループは, TRIFT をベースにした MALDI 質量マイクロスコプの開発を始めている³². イメージングに適した脱離イオン抽出方法などの検討課題はあるが, 質量顕微鏡の将来を見据えた先行開発として注目される. イオン像投影方式の分析部に利用できるイオン光学系として, 大阪大学のグループが開発した完全収束型の多重周回 TOF は極めて有望である³³. イオンに同一の軌道上を繰り返し周回させる新しいタイプの TOF であり, 飛行距離を長くして極めて高い質量分解能が得られるので, これをベースにした質量マイクロスコプの開発が望まれる.

4.3 操作性の課題

実用的な装置にとって操作性は基本性能以上に重要である. 操作性の課題はより良いマン-マシンインターフェイスの構築であり, 大部分はデータシステムが担っている. 商業的に成功した市販装置は必ず操作性を配慮したデータシステムを備えている. すでに述べたように質量顕微鏡のデータシステムの役割は多岐にわたるが, 普及に向けていっそうの自動化が要求される. ピクセル走査方式では, 膨大な回数の質量スペクトル測定を繰り返してイメージングするが, 最も単純な TOF の分析部でも最適化のパラメーターは複数あり, これらがすべて自動設定されなければ実用的ではない. 自作のデータシステム (MS Image Tool) にもパラメーター設定を記憶・復元する機能が備わっているが, 普及型装置ではさらに, 測定や試料調製の条件, イオン源のよごれや真空度など, すべての変動要因に対して装置の特性を最適化する自動チューニング機能を

備えていることが望ましい. 軟組織や細胞の試料調製は手間と熟練を要するが, 試料ごとに条件が異なるので完全な自動化は難しい. 試料調製法の標準化と併せて, ロボットによる半自動化は質量顕微鏡の普及を促進するであろう.

5. おわりに

組織スケールのイメージング質量分析は現在の技術水準でも可能であり, 従来の生検を補完する病理診断法, 薬物動態研究, 再生医療の基礎研究, 組織工学での品質管理など, 有望な用途は多岐にわたる. イメージング質量分析を細胞スケールで達成すれば, プロテオームやメタボローム, さらにシステムバイオロジーの構築や創薬の研究手段として, ほかでは代えられない大きな役割を担うことになる. 生体試料を対象にした質量顕微鏡開発はまさに臨界期にあり, この分野の国内での盛り上がり期待したい.

文 献

- 1) P. J. Todd, T. G. Schaaff, P. Chaurand, and R. M. Caprioli, *J. Mass Spectrom.*, **36**, 355 (2001).
- 2) P. Chaurand, S. A. Schwartz, and R. M. Caprioli, *Anal. Chem.*, **76**, 86A (2004).
- 3) M. L. Pacholski and N. Winograd, *Chem. Rev.*, **99**, 2977 (1999).
- 4) P. J. Todd, J. M. McMahon, R. T. Short, and C. A. McCandlish, *Anal. Chem.*, **69**, 529A (1997).
- 5) P. Chaurand and R. M. Caprioli, *Electrophoresis*, **23**, 3125 (2002).
- 6) M. Stoeckli, P. Chaurand, D. E. Hallahan, and R. M. Caprioli, *Nat. Med.*, **7**, 493 (2001).
- 7) A. Benninghoven, B. Hagenhoff, and E. Niehuis, *Anal.*

- Chem.*, **65**, 630A (1993).
- 8) A. Benninghoven and W. K. Sichteremann, *Anal. Chem.*, **50**, 1180 (1978).
 - 9) J. M. McMahon, N. N. Dookeran, and P. J. Todd, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **6**, 1047 (1995).
 - 10) A. Delcorte, N. Medard, and P. Bertrand, *Anal. Chem.*, **74**, 4955 (2002).
 - 11) C. C. Grimm, R. T. Short, and P. J. Todd, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2**, 362 (1991).
 - 12) B. Spengler and M. Hubert, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **13**, 735 (2002).
 - 13) P. Chaurand, G. Hayn, U. Matter, and R. M. Caprioli, Proceedings of the 52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville, TN, May 23–27, 2004, TPL210.
 - 14) M. Stoeckli, T. B. Farmer, and R. M. Caprioli, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **10**, 67 (1999).
 - 15) <http://rsb.info.nih.gov>
 - 16) B. J. Xu, R. M. Caprioli, M. E. Sanders, and R. A. Jensen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **13**, 1292 (2002).
 - 17) T. L. Colliver, C. L. Brummel, M. L. Pacholski, F. D. Swanek, A. G. Ewing, and N. Winograd, *Anal. Chem.*, **69**, 2225 (1997).
 - 18) J. M. McMahon, R. T. Short, C. A. McCandlish, J. T. Brenna, and P. J. Todd, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 335 (1996).
 - 19) L. Van Vaeck, K. Poels, S. De Nollin, A. Hachimi, and R. Gijbels, *Cell Biol. Int.*, **21**, 635 (1997).
 - 20) L. Van Vaeck, H. Struyf, W. Van Roy, and F. Adams, *Mass Spectrom. Rev.*, **13**, 209 (1994).
 - 21) M. Stoeckli, D. Staab, M. Staufenbiel, K.-H. Wiederhold, and L. Signor, *Anal. Biochem.*, **311**, 33 (2002).
 - 22) S. S. Rubakhin, W. T. Greenough, and J. V. Sweedler, *Anal. Chem.*, **75**, 5374 (2003).
 - 23) M. L. Reyzer, Y. Hsieh, K. Ng, W. A. Korfmacher, and R. M. Caprioli, *J. Mass Spectrom.*, **38**, 1081 (2003).
 - 24) J. Bunch, M. R. Clench, and D. S. Richards, Proceedings of the 52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville, TN, May 23–27, 2004, TPL 216.
 - 25) R. Holm and D. Holtkamp, "Microbeam Analysis—1989," ed. by P. E. Russell, San Francisco Press Inc., San Francisco (1989), pp. 325–329.
 - 26) J. Wei, J. M. Buriak, and G. Siuzdak, *Nature*, **399**, 243 (1999).
 - 27) S. Berkenkamp, M. Karas, and F. Hillenkamp, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 7003 (1996).
 - 28) J. I. Berry, S. Sun, Y. Dou, A. Wucher, and N. Winograd, *Anal. Chem.*, **75**, 5146 (2003).
 - 29) J. Y. Zhao, A. Dindyal-Popescu, G. Scott, M. Yang, and J. E. Wingate, Proceedings of the 52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville, TN, May 23–27, 2004, TPL215.
 - 30) B. W. Schueler, *Microsc. Microanal. Microstruct.*, **3**, 119 (1992).
 - 31) 村瀬 篤, 豊田中央研究所 R&D レビュー, **34**(2), 11 (1999).
 - 32) S. L. Luxembourg, T. H. Mize, L. A. McDonnell, and R. M. A. Heeren, *Anal. Chem.*, **76**, 5339 (2004).
 - 33) T. Matsuo, M. Toyoda, T. Sakurai, and M. Ishihara, *J. Mass Spectrom.*, **32**, 1179 (1997).

Keywords: Mass microprobe, Imaging mass spectrometry, Molecular imaging, Secondary ion mass spectrometry (SIMS), Laser microprobe mass spectrometry (LMMS), Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)